

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019340

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-435943  
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

24.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 2 月 2 6 日  
Date of Application:

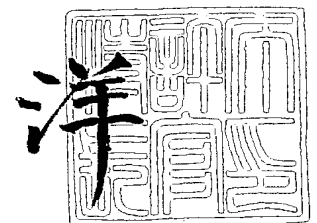
出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 4 3 5 9 4 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 3 - 4 3 5 9 4 3 ]

出      願      人            プリマハム株式会社  
Applicant(s):            独立行政法人食品総合研究所

2 0 0 5 年    2 月 1 8 日


特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



出証番号    出証特 2 0 0 5 - 3 0 1 2 1 . 7 1

【書類名】 特許願  
【整理番号】 2003P1920  
【提出日】 平成15年12月26日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12Q 1/68  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内  
    【氏名】 堀越 菜穂子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 1 2 独立行政法人食品総合研究  
    所内  
    【氏名】 川崎 晋  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内  
    【氏名】 岡田 幸男  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内  
    【氏名】 竹下 和子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県土浦市中向原 6 3 5 番地 プリマハム株式会社内  
    【氏名】 鮫島 隆  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 1 2 独立行政法人食品総合研究  
    所内  
    【氏名】 川本 伸一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台 2 - 1 - 1 2 独立行政法人食品総合研究  
    所内  
    【氏名】 一色 賢司  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000113067  
    【氏名又は名称】 プリマハム株式会社  
    【代表者】 貴納 順二  
【特許出願人】  
    【識別番号】 501407218  
    【氏名又は名称】 独立行政法人食品総合研究所  
    【代表者】 鈴木 建夫  
【代理人】  
    【識別番号】 100107984  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 廣田 雅紀  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100102255  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小澤 誠次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100118957  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岡 晴子



【選任した代理人】  
【識別番号】 100123168  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100120086  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 044347  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 9701840

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

食品中の 2 種以上の異なる特性の微生物を、1 本の P C R 反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する方法であって、

(A) 1 C F U / 1 0 0 g の微生物が 2 4 時間培養後に 1 0 <sup>3</sup> C F U / m l 以上となる培養条件下で培養する工程と、

(B) 少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物の D N A を抽出する工程と、

(C) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックス P C R を行う工程と

を含むことを特徴とする微生物の多重検出方法。

**【請求項 2】**

2 種以上の異なる特性の微生物が、リステリアモノサイトゲネスを含むことを特徴とする請求項 1 記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 3】**

特異的なプライマーが、配列番号 5 及び 6 に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項 2 記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 4】**

2 種以上の異なる特性の微生物が、病原性大腸菌 O 1 5 7 を含むことを特徴とする請求項 1 記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 5】**

特異的なプライマーが、配列番号 1 及び 2 に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項 4 記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 6】**

2 種以上の異なる特性の微生物が、サルモネラ属菌を含むことを特徴とする請求項 1 記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 7】**

特異的なプライマーが、配列番号 3 及び 4 に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項 6 記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 8】**

培養後の p H が 5 . 1 以上となる培養条件下で培養することを特徴とする請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 9】**

グルコース濃度が 0 . 1 5 % 以下の培地、及び／又は、リン酸緩衝液の濃度が 5 0 m M 以上若しくはそれと同等の緩衝能を有する培地で培養することを特徴とする請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 1 0】**

溶菌酵素を作用させた後、界面活性剤とタンパク質変性剤で処理し、遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿により D N A を析出して抽出することを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 1 1】**

溶菌酵素が、アクロモペプチダーゼ及び／又はリゾチームであることを特徴とする請求項 1 ~ 1 0 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 1 2】**

界面活性剤が、ソルビタンモノラウラートのエチレンオキシド縮合物であることを特徴とする請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 1 3】**

タンパク質変性剤が、グアニジンイソチオシアネートであることを特徴とする請求項 1 ~ 1 2 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 1 4】**

特異的なプライマーを各 1 2 0 n M 以下の濃度で組み合わせてマルチプレックス P C R を行うことを特徴とする請求項 1 ～ 1 3 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

**【請求項 1 5】**

食品が、食肉又は食肉加工品であることを特徴とする請求項 1 ～ 1 4 のいずれか記載の微生物の多重検出方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】微生物の多重検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、食品に存在する病原性大腸菌 O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで、公定法と同等又はそれ以上の高い感度で検出することができる微生物の多重検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、マルチプレックスPCRを利用する微生物の多重検出方法は、よく知られている。例えば、野菜・果実を対象として病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌を多重検出する方法（例えば、非特許文献1参照）、食品中の病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌を多重検出する方法（例えば、非特許文献2参照）、牛乳を対象として病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネス、カンピロバクター属菌の各菌を多重検出する方法（例えば、非特許文献3参照）、食品中のサルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを多重検出する方法（例えば、非特許文献4参照）、食品中の病原性大腸菌 O157等の大腸菌を多重検出する方法（例えば、非特許文献5参照）、牛乳を対象として病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌を多重検出する方法（例えば、非特許文献6参照）などが報告されている。また、マルチプレックスPCR用のプライマーとして、大腸菌の検出用プライマー（例えば、特許文献1参照）、病原性大腸菌 O157のO抗原検出用プライマー（例えば、特許文献2参照）も知られている。

【0003】

他方、微生物のDNAを抽出する方法として、結核菌等のマイコバクテリウムに溶菌酵素アクロモペプチダーゼ等を用いる方法（例えば、特許文献3参照）、グラム陰性、陽性菌に溶菌酵素アクロモペプチダーゼ等を用いる方法（例えば、特許文献4参照）、レジオネラ菌にプロテアーゼKやアクロモペプチダーゼ等を用いる方法（例えば、特許文献5参照）、大腸菌等にタンパク変性剤、還元剤、界面活性剤、キレート剤等を用いる方法（例えば、特許文献6参照）などが知られている。

【特許文献1】特開2001-95576号公報

【特許文献2】特開平11-332599号公報

【特許文献3】特開平6-165676号公報

【特許文献4】特表平9-500793号公報

【特許文献5】特開平5-317033号公報

【特許文献6】特開平6-289016号公報

【非特許文献1】Japanese Journal of Food Microbiology, Vol.19, No2, 47-55, 2002

【非特許文献2】Journal of Industrial Microbiology, & Biotechnology, 21, 92-98, 1998

【非特許文献3】Milchwissenschaft, 55 (9), 500-503, 2000

【非特許文献4】Journal of Food Protection, Vol.64, No11, 1744-1750, 2001

【非特許文献5】Molecular and Cellular Probes, 13, 291-302, 1999

【非特許文献6】Food Microbiology, 20, 345-350, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

1種類の微生物をPCR法によって検出する方法は既に確立されているが、複数の微生物をPCR法で同時に検出する方法は、食品分野で検討されつつあるものの、未だ十分に信頼できる方法は確立されていないというのが現状である。本発明の課題は、食品に存在

する病原性大腸菌 O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の汚染微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで、公定法と同等又はそれ以上の高い感度で検出することができる微生物の多重検出方法を提供することにある。すなわち、複数の対合プライマーを組み合わせる行うPCR法として知られているマルチプレックスPCRを用いて、病原性大腸菌 O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の汚染微生物を簡便に、かつ高い感度で再現性よく検出することができる微生物の多重検出方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

(培養)

危害の高い病原菌は、食品中で「陰性」(25g中に含まれていないこと)であることが定められており、その検出には、公定法と同等以上の精度が求められる。食品25g中1CFUレベルの微量に汚染した微生物を検出するためには、増菌培養が不可欠である。増菌培養する場合、通常、対象の病原菌ごとに個別に選択性のある培地を使用して培養するが、同時に数種の微生物を検出するために、増菌についても、1種の培地で複数の微生物を同時に増殖させるための検討を行った。なるべく短時間(24時間以内)で検出できる培養条件を設定する必要がある、そのためには、特に培地の選択が重要となる。同時に増菌することは、対象微生物同士が同科あるいは同属菌種、または発育特性が似ていれば比較的容易であるが、異種で発育特性が異なる微生物の場合は難しい。例えば、病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを検出対象とした場合、これら病原菌3菌種中で、サルモネラ、O157に比べて、低温発育性であるリステリアは増殖が遅いという問題があった。

【0006】

そこで、他の細菌が混在した中でも、特にリステリアが十分に増殖できるように、リステリアにとって好ましい栄養源を持つ培地で、炭水化物が少なく、緩衝能が高い培地について検討したところ、培地 No. 17(トリプトン5g、プロテオースペプトン5g、塩化ナトリウム5g、グルコース0.5g、リン酸二ナトリウム7g、リン酸一カリウム15g/1L中)は、トリプトソーヤブイヨンやBHI(ブレインハートインフュージョン)、BPW(Buffered peptone Water)よりも3種混在中でリステリアの増殖が最も良く、サルモネラとO157もリステリアより増殖が早かった。このことから、3種同時に検出するためには培地 No. 17が良いと考えられた。

(DNA)

PCR反応を行う際、DNAの抽出を行うが、DNAの抽出では溶菌操作が必要となる。グラム陽性細菌の溶解は、より厚くより高密度なペプチドグリカン層が主要細菌細胞壁成分であるため、グラム陰性細菌よりもかなり困難である。今回の技術ではサルモネラ、O157などのグラム陰性菌に加え、リステリアというグラム陽性菌も同時に検出する、という点で困難であった。また、食品からの抽出という点では、食品残渣は多様なものであり、溶菌法を1種類に特定するのは困難である。特に畜肉などに代表される検体では高タンパク、高脂肪、かつ個体差があるので、細菌の溶菌が一定の効率で行われないという、DNA抽出の上での困難性が存在した。さらに検討したところ、トリプトソーヤブイヨン、ミューラーヒントンブロスなど、培養する培地の違いによって、リゾチームだけでは細胞が壊れない(=DNAが抽出できない)リステリアがあった。培養条件は、たとえ同じ培地を使用しても食品の種類が異なったり、損傷程度が異なることで変わってくると考えられる。また、場合によっては、より回復の良い培地を用いる必要があるため、どのような場合でも細胞が壊れる抽出方法が必要であった。

【0007】

一般的なDNA抽出法として、ボイル法やアルカリ-SDS法が知られているが、ボイル法ではリステリアが高感度に抽出できないことを確認した。SDSは、DNA抽出において使用しやすい界面活性剤として知られているが、強力なPCR阻害剤であるため、抽出に用いた後には、完全に除去しなければならない。未習熟な実験者においても熟練者と

同様の効果と結果が得られるようにするためには、SDSのように低濃度の混入でも反応に影響を与える物質は好ましくなく、SDSは熟練者との抽出効率差が現われる原因になりうる危害要因と判断した。また、フェノール、クロロホルムは、危険で人体に有害な有機溶媒であり、この処理を行うことによってDNAの精製度は良くなるが、抽出効率に技術的な個人差が現われることが容易に想像でき、一定の感度が保障できない。また、特別な廃液処理が必要となることから、食品製造現場での検査法には適合しない抽出法であるということもできる。そこで、未習熟・熟練者においても操作が容易であり、かつDNAの抽出効率（言い換えれば検出感度）が一定であることが期待でき、さらに、食品製造現場で実行できる簡便さ・安全さを備えており、畜肉を代表とする高タンパクな食品からのDNA抽出法が可能な方法を開発する必要性があった。

#### 【0008】

培養液を5  $\mu$ mのフィルターを通すことで大きな食品くずを取り除き、その後溶菌酵素液（アクロモペプターゼとリゾチームの混合液）を混合し、37℃で1時間処理後、界面活性剤〔ツィーン20（Tween20）〕とタンパク質変性剤（グアニジンイソチオシアネート）の混合液を加えて完全に菌体を溶解できることがわかった。遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿を行いDNAを抽出した。処理の順番はアクロモペプターゼがリゾチームより先、もしくは一緒に行い、その後ツィーン20処理後、グアニジンイソチオシアネート処理、もしくはツィーン20とグアニジンイソチオシアネート処理を一緒に行う必要があった。ツィーン20は粘性が高く、単独で加えることが難しいため混合添加することが望ましいこともわかった。

#### 【0009】

また、フェノール、クロロホルム処理を行わなくても、アルコール沈殿やDNA抽出液添加量（PCR反応液50  $\mu$ lに対し2  $\mu$ l）によって、PCRで問題なく検出できる程度に可溶化したタンパク質を除くことができた。ツィーン20はPCR反応液にも使われるもので、SDSに比べ阻害が少なく、未習熟な実験者でも扱いが容易であると考えられた。また、もちろん、この抽出法はおのおの単独菌種での抽出においても可能である。さらに、（1）アクロモペプターゼ単独、（2）リゾチーム単独、（3）アクロモペプターゼ処理後グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、（4）リゾチーム処理後グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、（5）プロテイナーゼK、（6）プロテイナーゼK処理後グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、（7）グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理、（8）グアニジンイソチオシアネート+ツィーン20処理+加熱処理、の各方法についても試みたが、いずれも前記処理ほどリステリアを高感度に抽出できなかった。

#### （PCR反応）

数種の菌を同時に検出する方法としてマルチプレックスPCRを採用した。複数の対合プライマーを組み合わせて行うPCR法であるマルチプレックスPCR法には、互いにプライマーダイマーを生成したり、識別バンドが互いに干渉したり、重複したりすることがなく、融解温度の近い対合プライマーを選定して用いた。プライマーの選択や混合割合により、反応のしやすさ、検出限界に差が出てくることもわかった。マルチプレックスPCRを行う場合には、その後の判定に用いる電気泳動像に3菌種のバンドが同じような濃さで検出するようにプライマーの混合割合を調整する必要がある。3菌種が同じDNA濃度（20 pg）のとき、3菌種のバンドが同様の濃さで検出できるよう、調整した。6種のプライマーの混合割合はサルモネラ 120 nM、リステリア 100 nM、O157 80 nMが最も理想的な配合量であった。さらに低濃度の混合割合である、サルモネラ 30 nM、リステリア 25 nM、O157 20 nMにおいても検討したが、電気泳動による目視での検出が可能ではあるが困難であったことから、上記濃度が好ましいことがわかった。

#### 【0010】

また、PCR反応では、最終産生量が $10^{-8}$ M程度まで標的遺伝子を増幅できることが知られている。PCR反応では通常200 nM程度のプライマーを加えて行うが、このプ

ライマー量は明らかに過剰であることがわかった。特にマルチプレックス反応の場合、その過剰なプライマーによる生成産物（これは非標的産物を含む）により優位な反応のみが結果として得られる可能性が高い。このため、PCR反応においてプライマー量を制限することで最終産物量を制限することとマルチプレックス反応との関係を考慮した。もちろん、PCR反応にはプライマーダイマーなどを代表とする非増幅産物もプライマーを消費するため、下限の濃度は存在するが、検出器の感度最低限のプライマー濃度を設定することにより、より複数のマルチプレックス反応を成功させる可能性が期待できることもわかった。言い換えれば、プライマーの下限の濃度を検出器の感度に合わせることで、より複数の検出が期待できる。電気泳動や蛍光プローブ法、キャピラリー電気泳動法などによる検出器の限界を考慮した上で、100 nM程度での反応を行わざるを得ず、3種類の病原菌の検出を確認したが、検出器の感度上昇によってこの濃度を低く設定することができ、より多くの標的を一度に検出できると考えられる。より高感度な増幅産物検出法が実現した際には上記の考えを踏まえた上で最終産物量を制御することにより、より多数のマルチプレックスPCRによる多重同時検出を実現できることもわかった。

#### 【0011】

本発明によると、食品に存在する病原性大腸菌O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等又はそれ以上の高い感度で簡便に検出することができる。

#### 【0012】

すなわち本発明は、食品中の2種以上の異なる特性の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する方法であって、

- (A) 1 CFU/100 gの微生物が24時間培養後に $10^3$  CFU/ml以上となる培養条件下で培養する工程と、
- (B) 少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のDNAを抽出する工程と、
- (C) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程と

を含むことを特徴とする微生物の多重検出方法（請求項1）や、2種以上の異なる特性の微生物が、リステリアモノサイトゲネスを含むことを特徴とする請求項1記載の微生物の多重検出方法（請求項2）や、特異的なプライマーが、配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項2記載の微生物の多重検出方法（請求項3）や、2種以上の異なる特性の微生物が、病原性大腸菌O157を含むことを特徴とする請求項1記載の微生物の多重検出方法（請求項4）や、特異的なプライマーが、配列番号1及び2に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項4記載の微生物の多重検出方法（請求項5）や、2種以上の異なる特性の微生物が、サルモネラ属菌を含むことを特徴とする請求項1記載の微生物の多重検出方法（請求項6）や、特異的なプライマーが、配列番号3及び4に示される塩基配列からなるプライマーであることを特徴とする請求項6記載の微生物の多重検出方法（請求項7）や、培養後のpHが5.1以上となる培養条件下で培養することを特徴とする請求項1～7のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項8）や、グルコース濃度が0.15%以下の培地、及び／又は、リン酸緩衝液の濃度が50 mM以上若しくはそれと同等の緩衝能を有する培地で培養することを特徴とする請求項1～8のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項9）や、溶菌酵素を作用させた後、界面活性剤とタンパク質変性剤で処理し、遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿によりDNAを析出して抽出することを特徴とする請求項1～9のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項10）や、溶菌酵素が、アクロモペプチダーゼ及び／又はリゾチームであることを特徴とする請求項1～10のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項11）や、界面活性剤が、ソルビタンモノラウラートのエチレンオキシド縮合物であることを特徴とする請求項1～11のいずれか

記載の微生物の多重検出方法（請求項12）や、タンパク質変性剤が、グアニジンイソチオシアネートであることを特徴とする請求項1～12のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項13）や、特異的なプライマーを各120nM以下の濃度で組み合わせてマルチプレックスPCRを行うことを特徴とする請求項1～13のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項14）や、食品が、食肉又は食肉加工品であることを特徴とする請求項1～14のいずれか記載の微生物の多重検出方法（請求項15）に関する。

【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0013】

本発明の微生物の多重検出方法としては、食肉、食肉加工品、牛乳、野菜等の食品中の2種以上の異なる特性の微生物を、1本のPCR反応チューブで複数の標的遺伝子の増幅を行い、それを解析することで公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する方法であって、（A）1CFU/100gの微生物が24時間培養後に $10^3$ CFU/ml以上となる培養条件下で培養する工程と、（B）少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のDNAを抽出する工程と、（C）検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程とを含む方法であれば特に制限されず、検出対象の微生物としては、食品の汚染微生物であればどのようなものでもよく、リステリアモノサイトゲネス、病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、カンピロバクター属菌、腸炎ビブリオ、黄色ブドウ球菌、エルシニア属菌、大腸菌群、セレウス菌、コレラ菌、赤痢菌、ボツリヌス菌などを具体的に例示することができる。また、公定法とは、「食品衛生検査指針」（1990年 社団法人 日本食品衛生協会）に説明されている方法をいい、具体例が実施例9において説明されている。

#### 【0014】

本発明の微生物の多重検出方法によると、食品25g中1CFUレベルの微量に汚染した微生物を検出することが可能となるが、本発明の微生物の多重検出方法においては、食品汚染微生物の培養工程が必須とされる。食品汚染微生物の増菌培養における培養条件としては、1CFU/100gの微生物が24時間培養後に $10^3$ CFU/ml以上となる培養条件であれば特に制限されないが、緩衝能を有する培地を用いて培養後のpHが5.1以上となる培養条件下で培養することや、グルコース濃度が0.15%以下の培地、及び/又は、リン酸緩衝液の濃度が50mM以上若しくはそれと同等の緩衝能を有する培地で培養するのが好ましい。リン酸緩衝液以外の緩衝液としては、クエン緩衝液、酢酸緩衝液、乳酸緩衝液、酒石酸緩衝液、リンゴ酸緩衝液、トリス緩衝液、MOPS緩衝液、MES緩衝液等を挙げることができる。

#### 【0015】

本発明の微生物の多重検出方法においては、培養増殖させた食品汚染微生物からのDNA抽出工程が必須とされる。かかるDNA抽出工程としては、少なくとも、溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物のDNAを抽出する工程であれば特に制限されないが、溶菌酵素を作用させた後、界面活性剤とタンパク質変性剤で処理し、遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿によりDNAを析出して抽出する方法を好適に例示することができる。上記溶菌酵素としては、アクロモペプチダーゼ、リゾチーム、プロテアーゼK、キトサナーゼ、キチナーゼ、 $\beta$ -1,3-グルカナナーゼ、ザイモリアーゼ、セルラーゼ等を挙げることができ、これらは1種又は2種以上用いることができるが、中でもアクロモペプチダーゼ及び/又はリゾチームを用いることができる。上記界面活性剤としては、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン界面活性剤を挙げることができ、中でも非イオン界面活性剤であるソルビタンモノラウラートのエチレンオキシド縮合物、より具体的には、ツイーン20を好適に挙げることができる。上記タンパク質変性剤としては、グアニジンイソチオシアネート、尿素、塩酸グアニジン、トリクロロ酢酸、SDS、Triton X-100、デオキシコール酸等を挙げることができ、これらは1種又は2種以上用いることができるが、中でも溶菌効果や取扱い易さの点でグアニジンイソチオシアネートが好ましい。溶菌物からのDNAの抽出・析出は、遠心分離により不溶画分を取り除き、アルコール沈殿を行

うなど、公知の方法により行うことができる。

#### 【0016】

本発明の微生物の多重検出方法においては、前記抽出したDNAと、検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックスPCRを行う工程が必須とされる。使用するプライマーとしては、検出対象微生物特異的なプライマーであって、互いにプライマーダイマーを生成したり、識別バンドが互いに干渉したり、重複したりすることがなく、融解温度の近い対合プライマーを選択することが好ましい。また、その後の判定に用いられる電気泳動像に出現するバンドが同じような濃さで検出するようにプライマーの混合割合を調整することが好ましい。例えば、病原性大腸菌O157に特異的なプライマーとしては、配列番号1及び2に示される塩基配列からなるプライマーが、サルモネラ属菌に特異的なプライマーとしては、配列番号3及び4に示される塩基配列からなるプライマーが、リステリアモノサイトゲネスに特異的なプライマーとしては、配列番号5及び6に示される塩基配列からなるプライマーが好ましく、この場合、合計600 nM以下の濃度でプライマーを混合することが好ましく、また6種のプライマーの混合割合はサルモネラ 120 nM、リステリア 100 nM、O157 80 nMが最も好ましい。

#### 【0017】

PCR後の検出法としては、電気泳動法、蛍光プローブ法、キャピラリー電気泳動法、定量PCR法などにより行うこともできる

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

#### 【実施例1】

##### 【0018】

(既存培地での同時培養)

病原性大腸菌O157は*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894、サルモネラ属菌は*Salmonella Enteritidis* IFO 3313、リステリアモノサイトゲネスは*Listeria monocytogenes* ATCC 49594を用いた。また、肉由来菌には、シュードモナス (*Pseudomonas fragi*)、シトロバクター (*Citrobacter freundii*)、ラクトバチルス (*Lactobacillus viridescens*)、ロイコノストック (*Leuconostoc mesenteroides*) の4株を用いた。試験培地にはトリプトソーヤブイヨン (TSB; 日水製薬社製)、及び、Buffered Peptone

Water (BPW; ペプトン10 g、塩化ナトリウム5 g、リン酸一水素ナトリウム3.5 g、リン酸二水素カリウム1.5 g/1 L) の2つの培地を用いた。

##### 【0019】

病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを各1 CFU/100 ml、肉由来菌を各10<sup>4</sup> CFU/100 mlになるように試験培地に接種した。35℃で培養し、経時的に一般生菌数、O157数、サルモネラ数、リステリア数を計測した。一般生菌数は標準寒天培地 (日水製薬社製) を用い、35℃で48時間培養後の総コロニー数、O157数はデソキシコレート寒天培地 (日水製薬社製) を用い、35℃で24時間培養後の大腸菌様のコロニー数、サルモネラ数はMLCB寒天培地 (日水製薬社製) を用い、35℃で24時間培養後のサルモネラ様のコロニー数、リステリア数はPALCAM寒天培地 (Merck社製) を用い、35℃で48時間培養後のリステリア様のコロニー数をそれぞれ測定した。結果を図1に示す。その結果、いずれの培地でも特にリステリアモノサイトゲネスの増殖が弱かった。培養液のpHを測定したところ、pHの低下が認められた。

#### 【実施例2】

##### 【0020】

(培地の緩衝能および糖濃度の影響)

実施例1でリステリアモノサイトゲネスの増殖が弱かったのは培養後の培地のpHが低下したことが原因と考えられたため、各菌の増殖に及ぼす培地の緩衝能および糖濃度の影響を調査した。基本培地 (トリプトン5 g、プロテオースペプトン5 g、塩化ナトリウム

5 g/1 L 中) に、リン酸二ナトリウムおよびリン酸一カリウムを加えてリン酸濃度を 15 mM から 200 mM まで調整し (pH 6.3)、グルコースの濃度を 0% から 0.25% まで変化させて加えて、試験培地を作製した。実施例 1 で使用した、病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスを各  $1 \text{ CFU} / 100 \text{ ml}$ 、肉由来菌を各  $10^4 \text{ CFU} / 100 \text{ ml}$  になるように各試験培地に接種した。35℃で培養し、24 時間後の一般生菌数、O157 数、サルモネラ数、リステリア数、pH を計測した。結果を表 1 に示す。

## 【0021】

その結果、グルコース濃度 0.15% 以下の培地、またはリン酸濃度 50 mM 以上の培地、または培養後の pH を 5.1 以上に保持する培地を用いることによって病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスとも 24 時間培養で  $10^3 \text{ CFU} / \text{ml}$  以上 (PCR での検出に必要な菌数) に増殖した。以降の試験には表 1 の No. 17 の培地 (トリプトン 5 g、プロテオースペプトン 5 g、塩化ナトリウム 5 g、グルコース 0.5 g、リン酸二ナトリウム 7 g、リン酸一カリウム 15 g/1 L 中) を選定した。培地成分については、検出の目的とする細菌の存在環境や損傷程度に応じて、トリプトン、プロテオースペプトン以外の窒素源、グルコース以外の炭素源、リン酸以外の緩衝能を持つ物質も有効であり、また、増殖を促進する物質として無機塩類やピルビン酸もしくはピルビン酸塩、ツィーンなどの界面活性剤を添加した方がより好ましかった。

## 【0022】

## 【表 1】

No.	リン酸濃度 (mM)	グルコース濃度 (%)	一般生菌数 (CFU/ml)	O157 数 (CFU/ml)	サルモネラ数 (CFU/ml)	リステリア数 (CFU/ml)	pH	適用
1	15	0	$2.4 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$	$6.2 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	5.99	可
2		0.5	$1.6 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$	$5.6 \times 10^6$	$1.5 \times 10^6$	5.97	可
3		1.0	$3.0 \times 10^8$	$5.7 \times 10^6$	$4.3 \times 10^6$	$4.7 \times 10^5$	5.62	可
4		1.5	$2.8 \times 10^8$	$1.4 \times 10^6$	$3.0 \times 10^5$	$3.0 \times 10^4$	5.11	可
5		2.0	$3.2 \times 10^8$	$5.1 \times 10^4$	$9.1 \times 10^2$	$6.1 \times 10^2$	4.79	不可
6		2.5	$3.9 \times 10^8$	$2.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^3$	10	4.58	不可
7	30	0	$2.1 \times 10^8$	$3.2 \times 10^7$	$5.1 \times 10^6$	$6.2 \times 10^6$	6.13	可
8		0.5	$1.8 \times 10^8$	$2.7 \times 10^7$	$4.9 \times 10^6$	$5.9 \times 10^6$	6.10	可
9		1.0	$4.4 \times 10^8$	$2.0 \times 10^7$	$4.8 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$	5.94	可
10		1.5	$3.1 \times 10^8$	$4.3 \times 10^6$	$7.1 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	5.71	可
11		2.0	$6.8 \times 10^8$	$4.8 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$	$6.9 \times 10^3$	5.40	可
12		2.5	$5.7 \times 10^8$	$4.7 \times 10^5$	$1.6 \times 10^4$	$3.0 \times 10^2$	5.03	不可
13	50	0.5	$1.1 \times 10^8$	$2.4 \times 10^7$	$5.2 \times 10^6$	$6.1 \times 10^6$	6.12	可
14		2.5	$3.9 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$	$5.0 \times 10^4$	$3.4 \times 10^4$	5.62	可
15	100	0.5	$3.2 \times 10^8$	$2.5 \times 10^7$	$5.1 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	6.10	可
16		2.5	$6.2 \times 10^8$	$2.0 \times 10^7$	$4.2 \times 10^6$	$4.5 \times 10^6$	6.02	可
17	150	0.5	$4.4 \times 10^8$	$4.1 \times 10^7$	$5.4 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	6.17	可
18		2.5	$9.5 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$5.1 \times 10^6$	$8.0 \times 10^6$	6.22	可
19	200	0.5	$1.2 \times 10^8$	$3.2 \times 10^7$	$5.1 \times 10^6$	$5.8 \times 10^6$	6.17	可
20		2.5	$8.4 \times 10^7$	$3.8 \times 10^7$	$6.8 \times 10^6$	$9.0 \times 10^6$	6.15	可

## 【実施例 3】

## 【0023】

## (DNA抽出方法 1)

病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌を No. 17 培地 10 ml に接種し、35℃で24時間培養した。各培養液をそれぞれ 1 ml チューブに取り、15,000 r. p. m で5分間遠心分離を行い、菌体を回収した。その菌体回収物に溶菌酵素液 {20 mg/ml のアクロモペプチダーゼ 10  $\mu$  l と 20 mg/ml のリゾチーム 10  $\mu$  l と TE バッファー [1 mM EDTA を含む 10 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-塩酸緩衝液、pH 8] 180  $\mu$  l の混合液} を加え、37℃で1時間処理後、溶菌剤 (ツィーン 20 を 1~2% 添加した 4 M グアニジンイソチオシアネート溶液) を 300  $\mu$  l 加えて完全に菌体を溶解した。この溶液を光学顕微鏡で観察したところ、溶菌が十分に行われていることが確認できた。この溶液を 15,000 r. p. m で5分間遠心分離し、上澄み 400  $\mu$  l を別のチューブに移し、溶液中の DNA をイソプロパノールで沈殿させた後、遠心分離して目的の DNA を得た。

## 【実施例 4】

## 【0024】

## (DNA抽出方法 2)

同様に、病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌を No. 17 培地 10 ml に接種し、35℃で24時間培養した。各培養液をそれぞれ 1 ml チューブに取り、15,000 r. p. m で5分間遠心分離を行い、菌体を回収した。その菌体回収物に溶菌剤 (ツィーン 20 を 1~2% 添加した 4 M グアニジンイソチオシアネート溶液) を 500  $\mu$  l 加え、回収物を溶解した。100℃で10分間加熱し、5分間氷冷した。この溶液を光学顕微鏡で観察したところ、病原性大腸菌 O157 やサルモネラ属菌は溶菌できていたが、実施例 3 の DNA 抽出方法に比べるとリステリアモノサイトゲネスの溶菌の程度が少し劣っていた。また、リステリアモノサイトゲネスの溶菌を、1) 菌体回収物に 20 mg/ml のアクロモペプチダーゼ 10  $\mu$  l と TE バッファー 190  $\mu$  l の混合液を加え、37℃で1時間処理した液、2) 菌体回収物に 20 mg/ml のリゾチーム 10  $\mu$  l と TE バッファー 190  $\mu$  l の混合液を加え、37℃で1時間処理した液、3) 上記 1) 液に、溶菌剤 (ツィーン 20 を 1~2% 添加した 4 M グアニジンイソチオシアネート溶液) を 300  $\mu$  l 加え混合した液、4) 上記 2) 液に、溶菌剤 (ツィーン 20 を 1~2% 添加した 4 M グアニジンイソチオシアネート溶液) を 300  $\mu$  l 加え混合した液、5) 菌体回収物に 20 mg/ml のプロテイナーゼ K 1  $\mu$  l と TE バッファー 200  $\mu$  l の混合液を加え、37℃で1時間処理した液、6) 上記 5) 液に、溶菌剤 (ツィーン 20 を 1~2% 添加した 4 M グアニジンイソチオシアネート溶液) を 300  $\mu$  l 加え混合した液をそれぞれ用いて行い、光学顕微鏡で観察を行ったが、いずれもリステリアモノサイトゲネスの溶菌の程度が実施例 3 の DNA 抽出方法に比べると少し劣っていた。

## 【実施例 5】

## 【0025】

## (PCR 反応の条件設定)

実施例 3 で得た DNA 抽出液を用いて PCR 反応を行った。PCR は、次のプライマーを用いた。

配列番号 1 : GGC GGA TTA GAC TTC GGC TA

配列番号 2 : CGT TTT GGC ACT ATT TGC CC

配列番号 3 : GGG AGT CCA GGT TGA CGG AAA ATT T

配列番号 4 : GTC ACG GAA GAA GAG AAA TCC GTA CG

配列番号 5 : CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG

配列番号 6 : CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT

PCR 反応液は、10×Buffer 5  $\mu$  l、dNTP 溶液 4  $\mu$  l、UNG 0.5  $\mu$  l、AmpliTaq Gold 0.25  $\mu$  l、MgCl<sub>2</sub> 10  $\mu$  l (いずれも、アプライドバイオシステムズジャパン社製)、プライマー、DN

A抽出液  $2 \mu\text{l}$  に滅菌水を加えて合計  $50 \mu\text{l}$  とした。反応条件は  $50^\circ\text{C}$  で2分保持後、 $95^\circ\text{C}$  で10分反応させた後、 $95^\circ\text{C} \cdot 20$  秒、 $60^\circ\text{C} \cdot 30$  秒、 $72^\circ\text{C} \cdot 30$  秒を40回繰り返し、 $72^\circ\text{C}$  で7分保持後、 $4^\circ\text{C}$  で保管した。PCR産物は2.5%アガロースゲル電気泳動で確認した。プライマーの混合割合は病原性大腸菌O157用プライマー（配列番号1、2）各80 nM、サルモネラ属菌用プライマー（配列番号3、4）各120 nM、リステリアモノサイトゲネス用プライマー（配列番号5、6）各100 nMが最も理想的な配合量であった。例えば、さらに低濃度の混合割合である、病原性大腸菌O157用プライマー各20 nM、サルモネラ属菌用プライマー各30 nM、リステリアモノサイトゲネス用プライマー各25 nMにおいても検討したが、アガロース電気泳動による目視での検出は可能ではあるが多少困難であった。

#### 【実施例6】

##### 【0026】

（反応特異性の確認）

表2に示した病原性大腸菌O157を4株、サルモネラ属菌4株、リステリアモノサイトゲネス10株、病原性大腸菌O157以外の*Escherichia coli* 4株、リステリアモノサイトゲネス以外のリステリア属4株を用いて特異性の確認を行った。各菌株をトリプトソーヤブイヨン（日水製薬社製）で $35^\circ\text{C}$  24時間培養し、実施例3記載のDNA抽出および実施例5記載のPCR反応を行った。PCR反応の結果を2.5%アガロースゲル電気泳動で確認したところ、病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスでは電気泳動像の所定の位置にバンドが検出し、陽性であることが示された。一方、病原性大腸菌O157以外の*Escherichia coli*、リステリアモノサイトゲネス以外のリステリア属では、バンドが検出せず、陰性菌であることが示され、特異性に問題がないことを確認した。結果を表2に示した。

##### 【0027】

##### 【表2】

菌株名	結果
1-1 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	陽性
1-2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	陽性
1-3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	陽性
1-4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	陽性
2-1 <i>Salmonella</i> Typhimurium	陽性
2-2 <i>Salmonella</i> Enteritidis	陽性
2-3 <i>Salmonella</i> Enteritidis	陽性
2-4 <i>Salmonella</i> sp.	陽性
3-1 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-2 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-3 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-4 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-5 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-6 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-7 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-8 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-9 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
3-10 <i>Listeria monocytogenes</i>	陽性
4-1 <i>Escherichia coli</i> O152	陰性
4-2 <i>Escherichia coli</i>	陰性
4-3 <i>Escherichia coli</i>	陰性
4-4 <i>Escherichia coli</i>	陰性
5-1 <i>Listeria welshimeri</i>	陰性
5-2 <i>Listeria innocua</i>	陰性
5-3 <i>Listeria ivanovii</i>	陰性
5-4 <i>Listeria seeligeri</i>	陰性

## 【実施例 7】

## 【0028】

(肉成分混在系での検出限界の確認)

病原性大腸菌 O157:H7 ATCC 43894、サルモネラ属菌 IFO 3313、リステリアモノサイトゲネス ATCC 49594 を用いた。各菌を前記 No. 17 培地 10 ml に接種し、35℃で24時間培養を行い、菌株培養液を得た。また、鶏もも挽肉 25 g に No. 17 培地 225 ml を加え、30秒間ストマッカーで粉碎し、35℃で24時間培養した。この時の培養液の一般生菌数は  $3.1 \times 10^8$  CFU/ml であった。鶏もも挽肉の培養液を 9 ml ずつ分注し、これに各菌株培養液の 10 倍段階希釈液 1 ml をそれぞれ添加し、各菌株培養液の各希釈系列の肉試料液を作製した。それぞれの試料液を 5  $\mu$ m のフィルターを通し大きな食品くずを取り除いた後、実施例 3 記載の DNA 抽出および実施例 5 記載の PCR 反応を行い、2.5% アガロースゲル電気泳動により確認した。その結果、肉試料液での病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの検出限界は、いずれも  $10^3$  CFU/ml であることを確認した。結果の電気泳動図を図 2 に示した。

## 【実施例 8】

## 【0029】

(接種した食品からの病原菌の検出)

病原性大腸菌 O157:H7 ATCC 43894、サルモネラ属菌 IFO 3313、リステリアモノサイトゲネス ATCC 49594 を用いた。豚挽肉に各菌株が  $10^2$  CFU/25 g、 $10^1$  CFU/25 g、 $10^0$  CFU/25 g、 $10^{-1}$  CFU/25 g になるようそれぞれ接種した。接種した豚挽肉 25 g に No. 17 培地を 225 ml 加え、ストマッカーで30秒粉碎し、35℃で24時間培養した。各培養液を 5  $\mu$ m のフィルターを通すことで大きな食品くずを取り除いた後、実施例 3 記載の DNA 抽出および実施例 5 記載の PCR 反応を行い、2.5% アガロースゲル電気泳動により確認した。結果を図 3 に示す。その結果、いずれの菌株も 1 CFU/25 g 存在すれば検出できることを確認した。病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスなどの危害の高い病原菌は、食品中で「陰性」(25 g 中に含まれていないこと)であることが定められており、その検出には、公定法と同等以上の精度が求められる。本多重検出法は、公定法と同等以上の精度があることが確認された。

## 【実施例 9】

## 【0030】

(公定法と多重検出法との比較試験；市販食品からの病原菌の検出)

鶏肉や鶏肝など、20検体をスーパーから購入し、病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの検査を多重検出法により行うとともに公定法と比較した。また、公定法は、次の通りに行った。

## 【0031】

病原性大腸菌 O157 については、検体 25 g にノボジオシン加 mEC プロス (極東製薬工業社製) 225 ml を加え、ストマッカーで30秒粉碎した後、42℃で18時間培養し、クロモアガー O157 培地 (関東化学社製) およびマッコンキーソルビトール寒天培地 (日水製薬社製) に画線し、35℃で18～24時間培養した。クロモアガー O157 培地で藤色、マッコンキーソルビトール培地で半透明のピンク色を示したものを病原性大腸菌 O157 擬陽性とし、CLIG 寒天培地 (極東製薬工業社製) に画線し、35℃で18～24時間培養した。下層が黄色く、上層がピンクでかつ紫外放射により発光しないものを病原性大腸菌 O157 擬陽性とし、インドール反応を行い、陽性 (赤) のものについて凝集反応を行った。凝集反応は大腸菌 O157 検出キット「UNI」(Oxoid) を用いて行った。凝集反応で疑わしいコロニーをクロモアガー O157 培地、マッコンキーソルビトール寒天培地、TSI 培地 (日水製薬社製)、LIM 培地 (日水製薬社製) に画線し、35℃で24時間培養した。クロモアガ

ーO157培地で藤色、マッコンキーソルビトール寒天培地で半透明のピンク色、TSI培地で黄色、LIM培地で無変化のものについてPCR反応により病原性大腸菌O157であることを確認した。

#### 【0032】

サルモネラ属菌については、検体25gにEEMブイヨン（日水製薬社製）225mlを加え、ストマッカーで30秒粉碎した。35℃で18時間培養し、セレナイトシスチン基礎培地（日水製薬社製）10mlに1ml加え、43℃で15～18時間培養した。全体あるいは沈殿が赤色を呈したもののについて、1白金耳をMLCB寒天培地（日水製薬社製）に画線し、35℃で24時間培養後、黒色のコロニーを生じたものをサルモネラ属菌擬陽性とし、確認試験として、TSI寒天培地、LIM培地に画線した。35℃、24～48時間培養し、TSI培地で斜面が赤く高層が黒色で、LIM培地で無変化のものをサルモネラ属菌陽性とした。リステリアモノサイトゲネスについては、検体25gにUVMリステリア選択増菌ブイヨン（Merck社製）225mlを加え、ストマッカーで30秒粉碎した。30℃で48時間培養し、PALCAMリステリア選択寒天培地（Merck社製）に1白金耳画線した。35℃で48時間培養し、リステリア属陽性と判定されたもののについて、馬血液寒天培地（日水製薬社製）、標準寒天培地（日水製薬社製）に画線して、35℃、24～48時間培養した。溶血性が陽性のものについてオキシダーゼ反応、カタラーゼ反応、グラム染色、顕微鏡観察、アピリステリア（日本ビオメリュー社製）を行い、リステリアモノサイトゲネスと同定されたものをリステリアモノサイトゲネス陽性とした。

#### 【0033】

多重検出法については次のように行った。検体25gに、No. 17培地を225ml加え、ストマッカーで30秒粉碎し、35℃で24時間培養した。培養液を5μmのフィルターを通すことで大きな食品くずを取り除いた後、実施例3記載のDNA抽出および実施例5記載のPCR反応を行い、2.5%アガロースゲル電気泳動により確認した。結果を表3に示す。

#### 【0034】

その結果、病原菌が検出した検体は、公定法では病原性大腸菌O157 0検体、サルモネラ属菌 3検体、リステリアモノサイトゲネス 6検体、多重検出法では病原性大腸菌O157 0検体、サルモネラ属菌 3検体、リステリアモノサイトゲネス 8検体であり、公定法で陽性であった検体はいずれも多重検出法で陽性であった。また、公定法で陰性、多重検出法で陽性であったリステリアモノサイトゲネス2検体（表3、検体No. 5、15）について、No. 17での培養液をPALCAMリステリア選択寒天培地（Merck）に画線培養後、形成したコロニーの同定試験を行ったところ、リステリアモノサイトゲネスであることを確認した。このことから、本多重検出法では公定法に比べて同等以上の精度があることを確認した。

#### 【0035】

【表 3】

No.	サンプル		公定法				多重検出法		
	購入店	品名	一般生菌数 (CFU/g)	0157	サルモネラ属菌	リステリア	0157	サルモネラ属菌	リステリア
1	A	赤鶏むね挽肉 (国産)	1.7*10 <sup>6</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
2		若鶏ささみ挽肉 (国産)	3.7*10 <sup>7</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
3		若どりもも挽肉 (国産)	2.3*10 <sup>7</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
4		若どり肝 (国産)	3.0*10 <sup>5</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
5	B	国産若鶏ささみ挽肉	2.2*10 <sup>5</sup>	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性	陽性
6		国産若鶏ももこまざれ (解凍)	1.7*10 <sup>5</sup>	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性	陰性
7		国産若鶏むね挽肉	4.9*10 <sup>4</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
8		国産若鶏砂肝	6.0*10 <sup>5</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
9	C	親鶏モツ (国産)	3.6*10 <sup>5</sup>	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性	陰性
10		若鶏皮 (国産)	3.4*10 <sup>5</sup>	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性
11		若鶏挽肉 (国産)	4.8*10 <sup>6</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
12		若鶏ササミ (国産)	1.6*10 <sup>5</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
13	D	解凍鶏ハート (国内産)	8.6*10 <sup>6</sup>	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性
14		解凍若鶏ひざナンコツ (米国産フレッシュ解凍品)	2.7*10 <sup>5</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
15		鶏モモ小間 (チキンライス用) (国内産)	1.4*10 <sup>6</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陽性
16		若鶏モモ肉唐揚げ用 (S) (ブラジル産)	6.8*10 <sup>7</sup>	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性
17	E	国内産若鶏挽肉	3.8*10 <sup>6</sup>	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
18		国産若鶏筋なしササミ	1.2*10 <sup>4</sup>	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性
19		国産若鶏小間切れ	2.3*10 <sup>5</sup>	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性
20		国産若鶏スペアーリブ	2.5*10 <sup>6</sup>	陰性	陰性	陽性	陰性	陰性	陽性
			陽性数	0	3	6	0	3	8

## 【図面の簡単な説明】

## 【0036】

【図1】トリプトソーヤブイヨン (TSB) およびBuffered Peptone Water (BPW) 培地を用いた35℃培養での病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスおよび一般生菌数の挙動を示す図である。

【図2】病原性大腸菌O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌株を接種した肉試料液中 (一般生菌数:  $3.1 \times 10^8$  CFU/ml) での各菌株の多重検出法による検出限界を示す電気泳動像の図である。

## 【0037】

M: 分子量マーカー

レーン1~7は、病原性大腸菌O157接種区 (一般生菌数:  $3.1 \times 10^8$  CFU/ml) を示し、O157接種量は次の通り。

1:  $1.1 \times 10^7$  CFU/ml、2:  $1.1 \times 10^6$  CFU/ml、3:  $1.1 \times 10^5$  CFU/ml、4:  $1.1 \times 10^4$  CFU/ml、5:  $1.1 \times 10^3$  CFU/ml、6:  $1.1 \times 10^2$  CFU/ml、7: 11 CFU/ml

レーン8~14は、サルモネラ属菌接種区 (一般生菌数:  $3.1 \times 10^8$  CFU/ml) を示し、サルモネラ接種量は次の通り。

8:  $5.0 \times 10^6$  CFU/ml、9:  $5.0 \times 10^5$  CFU/ml、10:  $5.0 \times 10^4$  CFU/ml、11:  $5.0 \times 10^3$  CFU/ml、12:  $5.0 \times 10^2$  CFU/ml、13: 50 CFU/ml、14: 5 CFU/ml

レーン15~21は、リステリアモノサイトゲネス接種区 (一般生菌数:  $3.1 \times 10^8$  CFU/ml) を示し、リステリア接種量は次の通り。

15:  $1.1 \times 10^7$  CFU/ml、16:  $1.1 \times 10^6$  CFU/ml、17:  $1.1 \times 10^5$  CFU/ml、18:  $1.1 \times 10^4$  CFU/ml、19:  $1.1 \times 10^3$  CFU/ml、20:  $1.1 \times 10^2$  CFU/ml、21: 11 CFU/ml

【図 3】 病原性大腸菌 O157、サルモネラ属菌、リステリアモノサイトゲネスの各菌株を接種した豚挽肉を用い、多重検出法により各菌株を検出した結果を示す電気泳動像の図である。

【0038】

M: 分子量マーカー

レーン 1~4 は、リステリアモノサイトゲネス接種区を示し、リステリア接種量は次の通り。

1: 16 CFU/25 g、2: 1.6 CFU/25 g、3: 0.16 CFU/25 g、4: 0.02 CFU/25 g

レーン 5~8 は、サルモネラ属菌接種区を示し、サルモネラ属菌接種量は次の通り。

5: 110 CFU/25 g、6: 11 CFU/25 g、7: 1.1 CFU/25 g、8: 0.11 CFU/25 g

レーン 9~12 は、病原性大腸菌 O157 接種区を示し、O157 接種量は次の通り。

9: 85 CFU/25 g、10: 8.5 CFU/25 g、11: 0.85 CFU/25 g、12: 0.09 CFU/25 g

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Prima Meat Packers, Ltd.

<120> Multiple Detecting Method for Microorganism

<130> 2003P1920PH

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 1

ggcggattag acttcggcta

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 2

cgttttggca ctatttgccc

20

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>


<223> primer

<400> 3

gggagtccag gttgacggaa aattt

25

<210> 4



<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 4  
gtcacggaag aagagaaatc cgtacg

26

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> primer

<400> 5  
cggaggttcc gcaaaagatg

20

<210> 6  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial

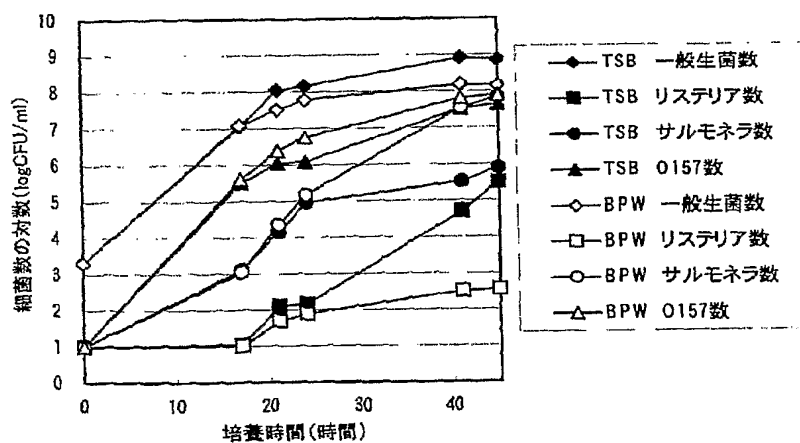
<220>  
<223> primer

<400> 6  
cctccagagt gatcgatggt

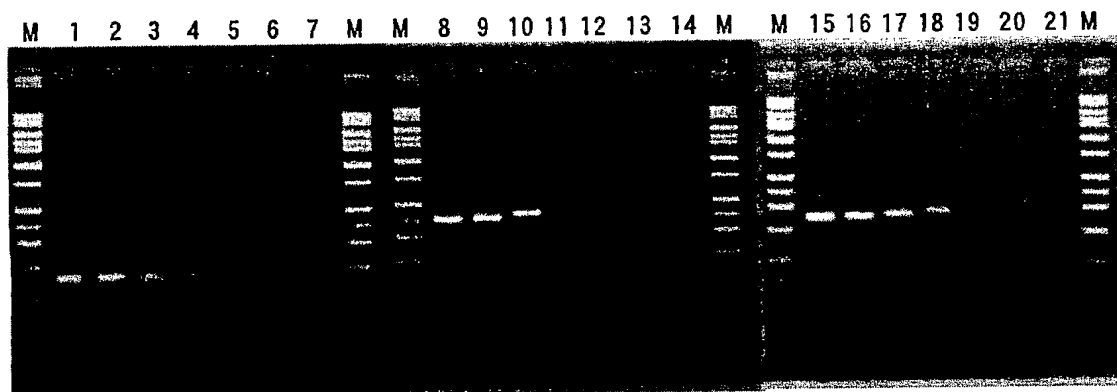
20

【書類名】 図面

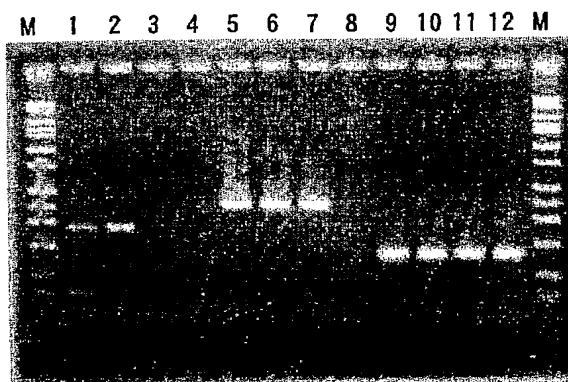
【図 1】



【図 2】



【図 3】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 食品に存在する病原性大腸菌 O157、リステリアモノサイトゲネス、サルモネラ属菌等の汚染微生物を、1本の反応チューブ内で同時に、公定法と同等又はそれ以上の高い感度で検出することができる微生物の多重検出方法を提供することにある。

**【解決手段】** (A)  $1 \sim 10 \text{ CFU} / 40 \text{ ml}$  の微生物が 24 時間培養後に  $10^3 \text{ CFU} / \text{ml}$  以上となる培養条件下、例えば培養後の pH が 5.1 以上となる培養条件下で培養する工程と、(B) 少なくとも、アクロモペプチダーゼ及び／又はリゾチームからなる溶菌酵素と界面活性剤とタンパク質変性剤で処理することにより、検出対象微生物の DNA を抽出する工程と、(C) 検出対象微生物に特異的なプライマーを混合し、マルチプレックス PCR を行う工程とからなり、食品中の 2 種以上の異なる特性の微生物を、1本の反応チューブ内で同時に、公定法と同等、又はそれ以上の高い感度で検出する。

## 認定・付加情報

特許出願の番号 特願 2003-435943  
受付番号 50302154585  
書類名 特許願  
担当官 第五担当上席 0094  
作成日 平成16年 1月 5日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】 000113067  
【住所又は居所】 東京都品川区東大井3丁目17番4号  
【氏名又は名称】 プリマハム株式会社

## 【特許出願人】

【識別番号】 501145295  
【住所又は居所】 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12  
【氏名又は名称】 独立行政法人食品総合研究所

## 【代理人】

申請人  
【識別番号】 100107984  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 廣田 雅紀

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100102255  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 小澤 誠次

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100118957  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂二丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 岡 晴子

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100123168  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂2丁目8番5号 若林ビル3階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 大▲高▼ とし子

## 【選任した代理人】



【識別番号】 100120086  
【住所又は居所】 東京都港区赤坂 2 丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階  
廣田特許事務所  
【氏名又は名称】 ▲高▼津 一也

特願 2 0 0 3 - 4 3 5 9 4 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 1 3 0 6 7 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 5 月 1 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都品川区東大井 3 丁目 1 7 番 4 号

氏 名

プリマハム株式会社

特願 2003-435943

出願人履歴情報

識別番号 [501407218]

1. 変更年月日 2001年11月27日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消  
[統合先識別番号] 501145295  
住所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地12  
氏名 独立行政法人食品総合研究所

特願 2 0 0 3 - 4 3 5 9 4 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 1 1 4 5 2 9 5 ]

1. 変更年月日 2 0 0 1 年 1 1 月 2 7 日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合  
[統合元識別番号] 5 0 1 4 0 7 2 1 8  
住 所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 1 2  
氏 名 独立行政法人食品総合研究所